

CT/JP03/09161

18.07.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 05 SEP 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 1 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 1 1 1 4 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 1 1 1 4 7]

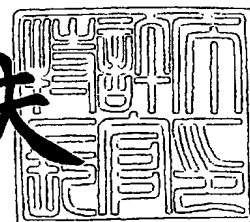
出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 8 月 2 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 4630044

【提出日】 平成14年 7月19日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/00

【発明の名称】 プローブ担体の製造方法及びプローブ担体

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【氏名】 石橋 亨

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【氏名】 岡田 良克

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

【氏名又は名称】 キャノン株式会社

【代表者】 御手洗 富士夫

【電話番号】 03-3758-2111

【代理人】

【識別番号】 100090538

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 恵三

【電話番号】 03-3758-2111

【選任した代理人】**【識別番号】** 100096965**【住所又は居所】** 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
社内**【弁理士】****【氏名又は名称】** 内尾 裕一**【電話番号】** 03-3758-2111**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 011224**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 9908388**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プローブ担体の製造方法及びプローブ担体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プローブが基材に固定されたプローブ担体の製造方法であって、

前記基材を用意する工程と、

アルコキシシリル基またはシラノール基を介して、チオール基を有する前記プローブを前記基材に固定することを特徴とするプローブ担体の製造方法。

【請求項2】 前記基材の表面に前記アルコキシシリル基またはシラノール基を有する前記基材を用意した後、

前記基材の前記アルコキシシリル基またはシラノール基と前記プローブの前記チオール基とを作用させることを特徴とする請求項1記載のプローブ担体の製造方法。

【請求項3】 前記アルコキシシリル基またはシラノール基を有する物質と前記チオール基を有するプローブとを含むプローブの混合溶液を用意し、

前記混合溶液を前記基材の表面に付与することを特徴とする請求項1記載のプローブ担体の製造方法。

【請求項4】 前記物質は、シランカップリング剤であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載のプローブ担体の製造方法。

【請求項5】 前記固定は、前記プローブを含む溶液を空間を飛翔させて前記基材の表面に付与することにより行うことを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載のプローブ担体の製造方法。

【請求項6】 前記プローブは、検出しようとする標的核酸の全部または一部に対して相補的な塩基配列を有し、前記標的核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることで前記標的核酸を検出する1本鎖核酸であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載のプローブ担体の製造方法。

【請求項7】 請求項1乃至6のいずれかの方法でプローブを基材に固定させたDNAチップ。

【請求項8】 プローブを基材に固定したプローブ担体であって、

前記基材を用意し、

更に、アルコキシシリル基またはシラノール基を介して、チオール基を有する前期プローブを前記基材に固定することで得られたプローブ担体。

【請求項9】 前記プローブは、検出しようとする標的核酸の全部または一部に対して相補的な塩基配列を有し、前記標的核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることで前記標的核酸を検出する1本鎖核酸であることを特徴とする請求項8記載のプローブ担体。

【請求項10】 請求項8または9記載のプローブ担体に、検知物質を含む検体を付与し、

前記プローブ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知することを特徴とする検知方法。

【請求項11】 請求項8または9記載のプローブ担体に、検知物質を含む検体を付与する手段と、

前記プローブ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知する手段とを備えることを特徴とする検知装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有効である多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）の作製に必要な、DNA断片の固相担体表面への固定方法に関する。また本発明は、そのDNA断片の固相担体表面への固定方法により製造された核酸プローブ担体（DNAチップ）に関する。

【0002】

【背景技術】

プローブを基材上に固定する方法としてはさまざまな方法が知られている。詳細としては、基材上においてプローブの合成を行うことにより基材上に固定する方法と、予め用意されたプローブをピンもしくはスタンプなどにより基材上に付与することにより固定する方法とがある。

【0003】

基材上にてプロープの合成を行う固定方法としては、例えば、米国特許第51438545号公報に記載されているように、基体の選択された領域からアクチベーターによって保護基を除去し、除去可能な保護基を有するモノマーを前記領域に結合させることを繰返すことにより、基体上で種々の配列を有するポリマーを合成する方法が知られている。

【0004】

また、予め用意されたプロープを基材上に付与することにより固定する方法としては、例えば、特開平8-23975号公報に記載されているように、基材及び該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることにより固定する方法が知られている。また、特開平8-334509号公報に記載されているように、生物学的に活性な物質の検出において、カルボジイミドを有する化合物上にカルボジイミド基を介して固定化することを用いて検出する方法が知られている。

【0005】

更に、特開2001-178442号公報には、末端部にチオール基を有するDNA断片と、チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基を有する鎖状分子が一方の末端で表面に固定された固相担体とを液相にて接触させることにより、DNA断片と鎖状分子との間で共有結合を形成させることによるDNA断片の固相担体表面への固定方法が記載されており、チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基としては、具体的にはマレイミジル基、 α 、 β -不飽和カルボニル基、 α -ハロカルボニル基、ハロゲン化アルキル基、アジリジン基、およびジスルフィド基からなる群より選ばれる基を含む置換基であると記載されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特開2001-178442号公報に記載の固定方法は、固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤を固相担体表面に接触処

理することで導入し、その後、シランカップリング剤と反応する末端とチオール基と反応する末端とを有する物質を反応させることで固相担体の表面を処理した固相担体表面上に、チオール基を有するプローブを反応させることによって、固相担体表面にプローブを固定しており、つまり、チオール基を有するプローブを固相担体表面に固定するためには、固相担体表面をシランカップリング剤で処理したあとに、更に処理が必要であった。

【0007】

そこで本発明は、プローブを基材に固定するために行う処理工程数を削減し、簡便にプローブの固定を行うプローブ固定方法を提供する。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、本発明は、

プローブが基材に固定されたプローブ担体の製造方法であって、前記基材を用意する工程と、アルコキシシリル基またはシラノール基を介して、チオール基を有する前記プローブを前記基材に固定するプローブ担体の製造方法に関する。

【0009】

また、本発明は、

プローブを基材に固定したプローブ担体であって、前記基材を用意し、更に、アルコキシシリル基またはシラノール基を介して、チオール基を有する前期プローブを前記基材に固定することで得られたプローブ担体に関する。

【0010】

また、本発明は、

上記記載のプローブ担体に、検知物質を含む検体を付与し、前記プローブ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知する検知方法に関する。

【0011】

また、本発明は、

上記記載のプローブ担体に、検知物質を含む検体を付与する手段と、前記プローブ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知する手段とを備える検知装置に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明は、プローブが基材に固定されたプローブ担体の製造方法であって、基材を用意する工程と、アルコキシシリル基またはシラノール基を介して、チオール基を有するプローブを基材に固定するプローブ担体の製造方法についての発明である。

【0013】

つまり、基材上にチオール基を有するプローブを固定する固定方法としては、基材の表面にアルコキシシリル基またはシラノール基を有する基材を用意した後、基材の前記アルコキシシリル基またはシラノール基とプローブのチオール基とを作用させて固定する固定方法と、アルコキシシリル基またはシラノール基を有する物質とチオール基を有するプローブとを含むプローブの混合溶液を用意し、混合溶液を基材の表面に付与することで固定する固定方法とがある。ここでいう作用とは、特に限定されず、例えば、共有結合、イオン結合、水素結合、疎水結合といった化学結合や、吸着または静電効果によるもの等が考えられる。

【0014】

基材としては、プローブを固定し、得られたプローブ固定基材を用いて検知物質（標的物質）を検出するのに支障のないものであれば特に限定されるものではないが、例えば無機材料または高分子材料などがあげられる。

【0015】

具体的には、基材に無機材料を使用する場合はアルコキシシリル基もしくはシラノール基を導入するために、基材表面をシランカップリング剤で処理したものが好ましい。この場合には効率的にシランカップリング剤で処理できるような材質、特に石英、ガラス、シリカ、アルミナ、タルク、クレー、アルミニウム、水酸化アルミニウム、鉄、マイカなどが好ましいが、酸化チタン、亜鉛華、酸化鉄などの酸化物などを使用することもできる。また、標的物質の検出や材料としての汎用性を考慮すると、アルカリ成分などが含まれない無アルカリガラスもしくは石英基板材料が特に好ましい。これら基材をシランカップリング剤で処理する際、該シランカップリング剤を加水分解することにより分子内にシラノール基

を2つ以上導入できるシランカップリング剤であることが必要であるが、3つ以上シラノール基を導入可能なシランカップリング剤が特に好ましい。3つ以上シラノール基を導入可能なシランカップリング剤としては、N- β （アミノエチル） γ -アミノプロピルトリアルコキシシラン、 γ -アミノプロピルトリアルコキシシラン、 γ -メルカプトプロピルトリアルコキシシラン、テトラアルコキシシラン、トリアルコキシアルキルシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリアルコキシシランなどがあげられる。さらにアルコキシシリル基としては、加水分解が速やかに行えるメトキシシリル基もしくはエトキシシリル基が好ましい。

【0016】

また高分子材料としては、アルコキシシリル基もしくはシラノール基を有する、高分子材料または、アルコキシシリル基もしくはシラノール基を容易に導入できる高分子材料が好ましい。例えば、ポリウレタンをアミノシランカップリング剤やメルカプトシランカップリング剤で処理する方法などがあげられる。

【0017】

なお、本発明におけるシランカップリング剤とは、樹脂などの有機化合物と反応しうる有機官能基と、ガラスなどの無機化合物とシロキサン結合を介して結合しうる部分を併せ持つ化合物のことを言う。また、本実施形態のシランカップリング剤は、アルコキシシリル基もしくはシラノール基を有し、基材と結合することが可能であれば、特に限定されるものではない。

【0018】

また、基材の形状は制約されるものではないが、DNAチップを例にあげるならば検出方法および装置などの汎用性から基板状であることが好ましい。更に、基板材料は、表面の平滑性が高い基板材料であることが好ましく、具体的には1 i n c h \times 3 i n c h、厚さ0.7~1.5 mm程度の基板であることが好ましい。

【0019】

上記基材の表面をシランカップリング剤で処理する際には、基材上を予め洗浄しておくことが好ましい。洗浄方法としては、水による洗浄、薬液による洗浄、プラズマによる洗浄、UVオゾンによる洗浄など多くの方法が知られているが、

簡易的に尚且つ均一に洗浄する方法としては、薬液による洗浄方法が適当である。基材の種類によっても好適な洗浄方法は異なるが、例えば基材としてガラスを用いる場合は、所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いて基材表面を十分に洗浄し、基材上に付着した汚れを除去する方法が挙げられる。具体的に述べるのであれば、60℃程度に加温した1mol/l水酸化ナトリウム水溶液を用意し、水溶液中で基材表面をワイピングするもしくは水溶液をシャワーリングしながらブラッシングすることにより基材上に付着した汚れを確実に除去する。汚れを除去した後、余分な水酸化ナトリウム分を十分に水で洗い流す。最後にN₂などの不活性ガスでブローするなどの方法で水分除去を行う。

【0020】

シランカップリング剤のコーティングの方法としては、浸漬法（ディッピング法）、スピンコート法、スプレーコート法などの方法が利用できる。特に簡便且つ均一に処理できる浸漬法が好ましい。濃度が0.1～2.0重量%の水に溶解させたシランカップリング剤水溶液に、洗浄した基材を浸漬し、反応終了後余分なシランカップリング剤を含む溶液を洗い流すことで処理をすることが好ましいが、コーティングの方法は、特に限定されるものではない。

【0021】

シランカップリング剤の種類によっては溶解させる際に、pHを調整しても良い。例えば、シランカップリング剤が溶媒に溶けにくい場合は、pHを低くすると良い。

【0022】

また、基材から余分なシランカップリング剤を除去し、100～120℃くらいの温度で乾燥させることが好ましいが、この乾燥工程を省略しても良い。

【0023】

本発明に使用されるプローブとしては、タンパク質（複合タンパク質を含む）、核酸、糖鎖（複合糖質を含む）、脂質（複合脂質を含む）等の生体高分子などが含まれる。具体的には、酵素、ホルモン、フェロモン、抗体、抗原、ハプテン、ペプチド、合成ペプチド、DNA、合成DNA、RNA、合成RNA、PNA、合成PNA、ガングリオシド、レクチンなどがあげられる。媒体中に含まれる

プローブの量としては、例えば核酸プローブの場合、プローブ安定性を考慮すると、媒体中には例えば2mer～500mer、特には2mer～80merの核酸プローブを、0.05～500 $\mu\text{mol/l}$ 、特には0.5～50 $\mu\text{mol/l}$ の濃度となるように調整することが好ましい。

【0024】

プローブにチオール基を導入する際、例えば、自動合成するDNAをプローブとする場合にはDNA自動合成機での合成時にチオールモディファイア (Thiol-Modifier) (グレンリサーチ (Glen Research) 社製) を用いる事ができる。なお、効率良くチオール基の導入することができれば、特に限定されるものではない。

【0025】

プローブの付与は、プローブを水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、インクジェット法、ピン法あるいはピン&リング法などによりアルコキシシリル基もしくはシラノール基を有する基材にスポットする。アルコキシシリル基を有する基材上にプローブを含む水性液をスポットした場合は、水性液に含まれる水によりアルコキシシリル基はシラノール基へと加水分解され、このシラノール基とプローブの持つチオール基とが作用し固定される。

【0026】

スポッティング方法に関し、上述した方法の中でも特にインクジェット法は高密度で尚且つ正確なスポッティングができることから好適なスポッティング方法である。インクジェット法とは、ごく細いノズルの中にプローブを含む溶媒を入れ、ノズルの先端近くを瞬間的に加圧ないし加熱し、ノズルの先端から正確に極微量のプローブを含む溶媒を飛び出させ、空間を飛翔させて基材面に付着させるというものである。インクジェット法によるスポッティング方法において、プローブ媒体に含まれる成分はプローブ媒体としてインクジェットヘッドから吐出させた時にプローブに対して実質的に影響を与えないものであって、且つインクジェットヘッドを用いて基材上に正常に吐出可能である媒体組成を満たすものであれば、特に限定されるものではない。例えば、インクジェットヘッドが媒体に熱エネルギーを付与して吐出させる機構を備えるバブルジェット (R) ヘッドであ

る場合、グリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコール、アセチレンアルコールを含む液体はプローブ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的に述べるのであれば、グリセリン5～10重量%、チオジグリコール5～10重量%、アセチレンアルコール0.5～1重量%を含む液体がプローブ媒体として好適に用いられる。また、インクジェットヘッドが圧電素子を用いて媒体を吐出させるピエゾジェットヘッドである場合、エチレングリコール、イソプロピルアルコールを含む液体はプローブ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的には、エチレングリコール5～10重量%、イソプロピルアルコール0.5～2重量%を含む液体がプローブ媒体として好適に用いられる。

【0027】

このようにして得られたプローブ媒体をインクジェットヘッドより吐出させ基材上に付着させた時、スポットの形状が円形で、また吐出された範囲が広がることがない。高密度にプローブ媒体をスポッティングした場合にも、隣接するスポットとの連結を有効に抑えることができる。なお、本発明のプローブ媒体の特性は上記のものに限定されるものではない。

【0028】

また、予めプローブとシランカップリング剤を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、インクジェット法もしくはピン法などの方法により、基材表面に接触させ、基材へのシラノール基の導入と、プローブの固定を同時に行っても良い。

【0029】

さらにスポットのプローブの乾燥を低減するために、プローブが溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、プローブが溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、チオジグリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、パオゲン、

カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、デキストラン、プルラン、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。高沸点の物質としては、エチレングリコールまたはジエチレングリコールを用いることがさらに好ましい。高沸点の物質の濃度は、プローブの水性液中、0.1～10容量%の範囲にあることが好ましい。また、プローブを付与した後の固相担体を、90%以上の湿度および20～50℃の温度範囲の環境にいてもよい。

【0030】

スポットティング後、過剰のプローブを洗浄して除去することが好ましい。プローブの種類にもよるが、チオール基を導入した1本鎖DNAプローブを用いた場合1分以内でプローブは固定されるが、10分以上放置した後に除去することが好ましい。

【0031】

このようにして得られたプローブ固定基材は、標的物質を検出するためのプローブ固定基材として好適である。

【0032】

ここで、このプローブ固定基材を用いて、例えば標的物質の検出等を行う場合の検出精度（S/N比）の向上を図ることを目的として、プローブを固相表面に固定した後、基材上のプローブ非結合部分が検体（サンプル）中に含まれる標的物質等と結合しないようにブロッキングを行っても良い。ブロッキングは例えば、基材を1～2%ウシ血清アルブミン水溶液中に、2時間程度浸すことにより行なわれる。しかし、基材上のプローブ固定部位以外への標識物質の吸着を防ぐ効果からすると、ウシ血清アルブミン水溶液が好適である。なお、このブロッキングの工程は必要に応じて行えば良く、例えばサンプルのプローブ固定基材への供給を各々のスポットに対して限定的に行い、スポット以外の部位へのサンプルの付着が実質的にない場合には行わなくても良い。スポット以外の部位へのサンプルが付着される場合においては基材となる材料や、シランカップリング剤の種類によって異なる。また、基材がガラス、石英などである場合において、シランカップリング剤のようなアルコキシシリル基もしくはシラノール基を有する物質と

チオール基を有するプローブを含むプローブ媒体をスポッティングする場合にも、ブロッッキング操作は必要ない。

【0033】

この様にして作製するプローブ固定基材はその用途に応じて、例えば同じプローブを含む複数のスポットを有するように構成しても良く、また異種のプローブを各々含む複数のスポットを有する様に構成してもよい。プローブの種類、数量、配置は必要に応じて適宜変更することが可能である。そしてこの様な方法によってプローブが高密度に配置されたプローブ固定基材は、その後標的物質の検出や、標的物質塩基配列の特定等に用いられる。例えばサンプル中に含まれている可能性のある、塩基配列が既知の標的物質である一本鎖核酸の検出に用いる場合には、標的物質の一本鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして用い、プローブを含む複数のスポットが固相上に配置されているプローブ固定基材を用意し、プローブ固定基材の各々のスポットに、検知物質を含むサンプルを付与して該標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を特に限定されないが、例えば蛍光、電流、電波もしくは磁力による検出等の既知の方法で検出する。それによって、サンプル中における標的物質の有無の検出を行うことができる。

【0034】

また、サンプル中に含まれている標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の特定に用いる場合には、標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の複数の候補を設定し、塩基配列群に対して各々相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして基材上にスポッティングする。次いで、各々のスポットにサンプルを供給して標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。これにより、標的物質の一本鎖核酸の塩基配列の特定を行うことができる。また本発明に係わるプローブ固定基材の他の用途としては、例えばDNA結合蛋白質が認識する特異的な塩基配列のスクリーニングやDNAに結合する性質を有する化学物質のスクリーニングへの適用が考えられる。

【0035】

ハイブリダイゼーションは標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に付与することによって実施することが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃の温度範囲で、そして2～20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0036】

DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。1塩基ミスマッチ（1塩基変異）の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を2種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

【0037】

以下、実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明する。

【0038】**【実施例】****[実施例1]****(1) 基材の作製**

スライドガラスを予め60℃に加温した1mol/l水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を10分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水

中にスライドガラスを浸漬し、超音波洗浄を10分間行った。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着したパーティクルを水洗、除去した。その後、このスライドガラスをスピンドライで乾燥させた。

【0039】

アミノシランカップリング剤（商品名：KBM-603；信越化学工業（株）社製）を1重量%になるように溶解して30分間攪拌し、この水溶液にスライドガラスを30分間浸漬させた後取り出して水で洗浄し、オープン中に入れ120℃で1時間乾燥させた。

（2）プローブの合成

本実施例においてプローブは、検出しようとする標的核酸の全部または一部に対して相補的な塩基配列を有し、該標的核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズ（交雑反応）することで該標的核酸を検出する1本鎖核酸を用いた。DNA自動合成機を用いて配列番号1および、配列番号1と1塩基のみ異なる配列番号2の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号1および配列番号2の一本鎖DNA末端にはDNA自動合成機での合成時にチオールモディファイア（Thiol-Modifier）（グレンリサーチ（GlenResearch）社製）を用いる事によってチオール基を導入した。続いて通常の脱保護を行い、DNAを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTTTC
CA3'（配列番号：1）

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCCTCGTTTTC
CA3'（配列番号：2）

（3）プローブの固定

上記（2）で合成した2種のDNA断片（配列番号：1および配列番号：2）それぞれをグリセリン7.5重量%、尿素7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールEH；川研ファインケミカル（株）社製）1重量%を含む水溶液に、0.6ODになるよう溶解させた。なお、オリゴヌクレオチドを1mlに溶解し、1cmの光路長のセルにおいて260nmの吸光度が1となる量が1ODである。

【0040】

これらのDNA断片を含む水溶液それぞれをバブルジェット（R）プリンター（商品名：BJ-F850；キヤノン（株）社製を平板への印刷が可能なように改造を施したもので、BJヘッドとスライドガラスの間隔は約1mm、吐出量は約4plである。）で、上記（1）の方法によって作製したスライドガラスに別々にスポッティングした。この際、15倍のルーペによる観測ではサテライトスポット（液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット）は観測されなかった。

【0041】

プローブを含む溶液をスポッティングしたスライドガラスを室温で10分間放置し、1MNaCl／50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）で洗浄した。

（4）ブロッキング・ハイブリダイゼーション反応

1MNaCl／50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）に1.0重量%になるようウシ血清アルブミンを溶解させ、上述の方法で作製したDNAチップを室温で2時間浸漬させ、ブロッキング反応を行った。

【0042】

配列番号1のプローブと相補的な核酸配列を有するDNA断片の5'末端にローダミンを結合させて標識化したDNA断片を合成し、これを1MNaCl／50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）に50nMになるように溶解させた。ブロッキング処理を行ったDNAチップをこの標識化したDNA断片を含む溶液に浸漬し、45℃で2時間放置した。その後、1MNaCl／50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）で未反応のDNA断片を洗浄し、さらに純水で洗浄を行った。

（5）結果

ハイブリダイゼーションを行ったDNAチップを蛍光スキャナ（商品名：GenePix4000B；Axon Instruments, Inc. 製）で波長532nmの蛍光観測を行った。その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45μmであった。そしてPMT400V、レーザーパワー100%で測定した場合に、配列番号1のプローブに起因する蛍光強度は21692であり、1塩基ミスマッチである配列番号2のプローブに起因する蛍光強度は13

346であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は419であった。これにより、1塩基ミスマッチも検出することができた。

【0043】

[実施例2]

(1) 基材の作製

アミノシランカップリング剤として商品名：KBM-903（信越化学工業（株）社製）を用いた以外は、実施例1と同様にして基材を作製した。

(2) プローブの固定

配列番号1のプローブを0.6ODになるよう、グリセリン7.5重量%、尿素7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールEH；川研ファインケミカル（株）社製）1重量%を含む水溶液に溶解させ、同様の方法でスポットティングをした。

(3) ブロッキング・ハイブリダイゼーション反応

実施例1と同様にブロッキング・ハイブリダイゼーション反応を行った。

(4) 結果

各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45 μ mである。そして蛍光強度はPMT400V，レーザーパワー100%で測定した場合に、29998であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は393であった。

【0044】

[実施例3]

アミノシランカップリング剤として商品名：KBM-602（信越化学工業（株）社製）を用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロッキング反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光を観察した。

【0045】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は40 μ mである。そして蛍光強度はPMT400V，レーザーパワー100%で測定した場合に、20675であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は442であった。

【0046】

[実施例4]

シランカップリング剤としてエポキシシランカップリング剤（商品名：A-187；日本ユニカー（株）社製）を用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロック反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光を観察した。

【0047】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は $55\mu\text{m}$ である。そして蛍光強度はPMT400V，レーザーパワー100%で測定した場合に、10677であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は576であった。

【0048】

[実施例5]

シランカップリング剤としてメルカプトシランカップリング剤（商品名：A-189；日本ユニカー（株）社製）を用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロック反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光を観察した。

【0049】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は $45\mu\text{m}$ である。そして蛍光強度はPMT400V，レーザーパワー100%で測定した場合に、8554であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は554であった。

【0050】

[実施例6]

シランカップリング剤としてトリメトキシメチルシラン（東京化成工業（株）社製）を用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロック反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光を観察した。

【0051】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は $45\mu\text{m}$ である。そして蛍光強度はPMT400V，レーザーパワー100%で測定した場合に、1

0475であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は1363であった。

【0052】

【実施例7】

シランカップリング剤としてテトラメトキシシラン（商品名：KBM-13；信越化学工業（株）社製）を用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロッキング反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光観察した。

【0053】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45 μm である。そして蛍光強度はPMT400V，レーザーパワー100%で測定した場合に、5804であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は916であった。

【0054】

【実施例8】

（1）基材の作製

スライドガラスを予め60℃に加温した1mol/l水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を10分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にスライドガラスを浸漬し、超音波洗浄を10分間行った。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着したパーティクルを水洗、除去した。その後、このスライドガラスをスピンドライで乾燥させた。

（2）プローブの固定

アミノシランカップリング剤（商品名：KBM-603；信越化学工業（株）社製）を1重量%になるよう、グリセリン7.5重量%、尿素7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールEH；川研ファインケミカル（株）社製）1重量%を含む水溶液に、溶解させ、20分間攪拌した。続いて合成したDNA断片（配列番号：1）を、このシランカップリング剤を含む溶液に0.6ODになるよう溶解させた。

【0055】

このシランカップリング剤とDNA断片を含む溶液をバブルジェット（R）プリンター（商品名：BJ-F850；キヤノン（株）社製を平板への印刷が可能なように改造を施したもの）で、上記（1）の方法によって作製したスライドガラスにスポッティングした。この際、15倍のルーペによる観測ではサテライトスポット（液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット）は観測されなかった。

【0056】

シランカップリング剤とプローブを含む溶液をスポッティングしたスライドガラスを室温で20分間放置し、1M NaCl / 50 mMリン酸緩衝溶液（pH 7.0）で洗浄した。

（3）ハイブリダイゼーション反応

配列番号1と相補的な核酸配列を有するDNA断片の5'末端にローダミンを結合させて標識化したDNA断片を合成し、これを1M NaCl / 50 mMリン酸緩衝溶液（pH 7.0）に50 nMになるように溶解させた。ブロッキング処理を行ったDNAチップをこの標識化したDNA断片を含む溶液に浸漬し、45℃で2時間放置した。その後、1M NaCl / 50 mMリン酸緩衝溶液（pH 7.0）で未反応のDNA断片を洗浄し、さらに純水で洗浄を行った。

（4）結果

ハイブリダイゼーションを行ったDNAチップを蛍光スキャナ（商品名：GenePix 4000B；Axon Instruments, Inc. 製）で波長532 nmの蛍光観測を行った。その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45 μmである。そして蛍光強度はPMT 400 V、レーザーパワー100%で測定した場合に、4831であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は284であった。

【0057】

（比較例1）

プローブとして、配列番号1のプローブのチオール基をカルボキシル基に変えた一本鎖核酸（配列番号：3）と、アミノ基に変えた一本鎖核酸（配列番号：4

)

5' HOOC-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTT
TACA 3' (配列番号: 3)

5' H₂N-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTT
ACA 3' (配列番号: 4)

を用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロッキング反応を行った。これら一本鎖核酸と相補的な核酸配列を有するDNA断片の5'末端にローダミンを結合させて標識化したDNA断片を用いて実施例2と同様にハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光観察した。

【0058】

その結果、配列番号: 3では、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45 μmである。そして蛍光強度はPMT 400 V, レーザーパワー100%で測定した場合に、930であり、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は126であった。また、配列番号: 4においては、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は50 μmである。そして蛍光強度はPMT 400 V, レーザーパワー100%で測定した場合に、1202であり、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は114であった。

【0059】

このことから、本発明におけるプローブはチオール基を有している場合に最も有効であることがわかる。

【0060】

(比較例2)

シランカップリング剤KBM-903の代わりに、メトキシトリメチルシランを用いた以外は、実施例2と同様にしてDNAチップを作製し、ブロッキング反応を行った。配列番号: 1と相補的な核酸配列を有するDNA断片の5'末端にローダミンを結合させて標識化したDNA断片を用いて実施例2と同様にハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光観察した。

【0061】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は55 μmである。そ

して蛍光強度はPMT 400 V, レーザーパワー100%で測定した場合に、1316であり、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は85であった。

【0062】

このことから、アルコキシシリル基もしくはシラノール基が分子内に2つ以上あることが有効であることがわかる。

【0063】

【発明の効果】

本発明の製造方法により、プローブを簡便な方法で基材に固定することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブを基材に固定するために行う処理工程数を削減し、簡便にプローブの固定を行うプローブ担体の製造方法を提供する。

【解決手段】 プローブが基材に固定されたプローブ担体の製造方法であって、前記基材を用意する工程と、アルコキシシリル基またはシラノール基を介して、チオール基を有する前記プローブを前記基材に固定することを特徴とするプローブ担体の製造方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 1 1 1 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キヤノン株式会社